

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

D2

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 septembre 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/68068 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/00

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00816

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 19 mars 2001 (19.03.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/03430 17 mars 2000 (17.03.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : BAULIEU,
Etienne-Emile [FR/FR]; 16, rue Berteaux Dumas,
F-92200 Neuilly sur Seine (FR). ROBEL, Paul [FR/FR];
36, rue Santos Dumont, F-75015 Paris (FR). FELLOUS,
Esther [FR/FR]; 3, rue Gracieuse, F-75005 Paris (FR).
MURAKAMI, Koichi [JP/JP]; 7-7 Tenjinchachi 2-chome,
Kanazawa 920 (JP).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOUNDS CAPABLE OF BINDING WITH PROTEINS CONSTITUTING OR ASSOCIATED WITH THE CY-
TOSKELETON ELEMENTS AND THEIR USES FOR PRODUCING MEDICINES

(54) Titre : COMPOSES CAPABLES DE SE LIER A DES PROTEINES CONSTITUANTES OU ASSOCIEES AUX ELEMENTS
DU CYTOSQUELETTE ET LEURS APPLICATIONS POUR LA FABRICATION DE MEDICAMENTS

(57) Abstract: The invention concerns the use of steroids and non-toxic compounds, capable of crossing the blood brain barrier characterised in that they are capable of binding the same site as pregnenolone on proteins constituting or associated with elements of the cytoskeleton and of displacing the MAP₂-bound pregnenolone, and of influencing the assembling and stabilisation of microtubules. The invention is particularly useful for treating the nervous system, for fighting against ageing of cells containing MAP_s, and for treating cancers.

(57) Abrégé : L'invention vise l'utilisation de stéroïdes et de composés non toxiques, capables de passer la barrière hémato-encéphalique caractérisés en ce qu'ils sont capables de lier le même site que la prégnénolone sur les protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette et de déplacer la prégnénolone liée à MAP₂, ainsi que d'influer sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Application, notamment, au traitement du système nerveux, pour lutter contre le vieillissement des cellules contenant des MAP_s, et pour le traitement de cancers.

WO 01/68068 A2

"Composés capables de se lier à des protéines constitutantes ou associées aux éléments de cytosquelette et leurs applications pour la fabrication de médicaments".

L'invention concerne des composés capables de se lier à des protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette.

Elle vise plus spécialement leurs applications pour la fabrication de médicaments pour le traitement de pathologies impliquant des dysfonctionnements de ces protéines.

Le cytosquelette est un réseau complexe (voir référence bibliographique (1) en fin de description) qui comprend les réseaux primaires de trois classes de filaments cytosquelettiques (microtubules, microfilaments, et filaments intermédiaires) auxquels s'ajoute un réseau microtrabéculaire qui comprend la majorité des protéines associées aux microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires. La protéine MAP₂ (famille des Microtubules Associated Proteins décrites ci-après) est un exemple caractéristique de composant de ce réseau: elle possède un domaine de liaison aux microtubules, mais également aux microfilaments (2,3) et aux filaments intermédiaires (4,5).

Les microtubules sont des cylindres creux de 25 nm de diamètre externe dont la paroi est constituée de protofilaments, eux-mêmes formés par l'empilement de sous-unités globulaires α et β de tubuline (50 Kd). Aux hétérodimères de tubuline sont associées, de façon périodique, les protéines appelées MAP_s (microtubule associated proteins) dont le rôle est de faciliter l'assemblage de la tubuline, mais aussi l'organisation et les fonctions du réseau microtubulaire.

La tubuline présente une grande hétérogénéité. Elle comprend en effet de nombreuses isoformes provenant à la fois de l'expression de plusieurs gènes et de très nombreuses modifications post-traductionnelles (6).

5

Les MAP_s sont divisées en deux groupes à savoir, les MAP_s "structurales" impliquées dans l'assemblage des tubulines et les MAP_s "motrices" qui utilisent les microtubules comme rails pour assurer le mouvement de certaines molécules et organelles.

10

Les MAP_s structurales visées dans l'invention comprennent plusieurs familles de protéines à savoir, les protéines MAP₁ A et B (350 Kd) codées par des gènes distincts, les protéines MAP₂ A et B de haut poids moléculaire (300 Kd), les protéines MAP₂ C et D de bas poids moléculaire (70 Kd environ), les protéines MAP₃ A et B (180 Kd) présentes dans les neurones jusqu'à 10 jours après la naissance, les protéines MAP₄ A, B et C (215 à 240 Kd) ubiquitaires, à propriétés très voisines de celles de MAP₂, les protéines Tau (50-67 Kd ou 110-120 Kd), les protéines STOP (145 Kd), molécules très stabilisantes des microtubules.

15

20

Dans le neurone, les microtubules sont impliqués dans de nombreuses fonctions (la croissance neuritique, le maintien de morphologies complexes comme les arborisations dendritiques, le transport axonal de molécules diverses). Par exemple, les protéines MAP₂ participent à l'arborisation dendritique, alors que les protéines tau sont essentielles pour la croissance axonale. On sait également que les différents isotypes de chaque MAP ont une localisation et des rôles spécifiques. MAP₂ B augmente son

25

30

expression du stade foetal au stade adulte. MAP₂ A s'exprime seulement à partir d'un certain stade de développement. MAP₂ C (2), qui s'exprime essentiellement dans les stades précoces de développement, est encore
5 présente dans le bulbe olfactif (7) et dans les cellules photoréceptrices de la rétine (8) de l'adulte. MAP₂ D est localisée au niveau de l'hippocampe dès le stade foetal (3).

10 Les microfilaments sont des polymères constitués d'actine (43 Kd). Très abondants dans la région corticale de l'axone, on les trouve aussi dans la région centrale où ils participent à son architecture dynamique.

15 Les filaments intermédiaires des neurones, polymères constitués par un triplet de protéines (68, 150, et 200 Kd), sont présents dans les neurones différenciés. Interconnectés avec les microfilaments et les microtubules, ils aident au maintien de l'architecture neuronale, les
20 MAP₂ servant de pont entre les trois types de structures filamenteuses cytosquelettiques.

Après avoir mis en évidence, une liaison saturable de haute affinité dans le cytosol de cerveau de rat (foetus et
25 adulte jeune) avec des stéroïdes, les inventeurs ont constaté que des préparations hautement purifiées de MAP₂ possédaient les mêmes caractéristiques de liaison.

Des travaux *in vitro* des inventeurs ont également démontré
30 une action spécifique de stéroïdes sur la polymérisation des structures du cytosquelette.

Or, actuellement, on considère que les effets des stéroïdes s'exercent par l'intermédiaire de récepteurs solubles intracellulaires d'une autre classe protéique. Ces récepteurs ont été clonés et souvent classés comme "nucléaires" du fait de leur mode d'action en tant que facteurs de transcription au niveau du génome.

Une série d'observations publiées au cours des 20 dernières années indique que des récepteurs pour des stéroïdes fonctionnent également au niveau de la membrane plasmique de cellules cibles, l'action des neurostéroïdes au niveau de récepteurs des neurotransmetteurs en étant un exemple important.

En mettant en évidence une interaction directe de stéroïdes, plus spécialement de la prégnénolone (PREG en abrégé), avec des protéines constituant ou associées aux éléments du cytosquelette, les inventeurs ont révélé un nouveau mécanisme d'action de ces composés, pouvant être avantageusement mis à profit pour intervenir sur toutes les fonctions impliquant les microtubules, filaments intermédiaires et microfilaments, y compris la croissance, la différenciation, la plasticité des neurones, la prévention et la réparation des affections et lésions neurodégénératives, et plus généralement tous les phénomènes de division cellulaire.

De manière générale, ce nouveau mécanisme d'action concerne tout composé non toxique, capable de passer la barrière hémato-encéphalique, et capable de lier le même site que la PREG sur lesdites protéines, ou de déplacer la PREG, et

d'exercer un effet sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules.

L'invention a donc pour but de fournir des composés
5 capables de se lier aux protéines constitutantes ou
associées aux éléments du cytosquelette tels qu'identifiés
par une méthode de criblage, comprenant la mise en contact
de ces composés avec lesdites protéines, dans des
conditions permettant l'établissement d'une liaison lorsque
10 la protéine, MAP₂ par exemple, est un récepteur pour le
composé.

L'invention vise tout particulièrement l'utilisation de
tels composés pour la fabrication de médicaments pour le
15 traitement de pathologies impliquant ces protéines.

Les composés utilisables selon l'invention pour la
fabrication de médicaments sont plus spécialement des
hormones stéroïdes, (ce terme étant utilisé dans la
20 description et les revendications pour couvrir leurs
conjugués, comme les esters sulfates, ou les esters
d'acides gras), leurs précurseurs, leurs métabolites,
libres ou conjugués, ainsi que leurs analogues, stéroïdiens
ou non stéroïdiens.

25 Comme précurseur d'hormones stéroïdes, on citera en
particulier la prégnénolone ou ses esters, notamment le
sulfate de prégnénolone (PREGS), pour lesquels aucun
récepteur intracellulaire n'a été identifié à ce jour.

30 Les analogues sont des agents pharmaceutiques capables
d'augmenter la formation des microtubules, de les

stabiliser dans les conditions données dans les exemples en rapport avec PREG, d'entrer en compétition avec PREG pour la liaison à MAP₂ et de passer la barrière hémato-encéphalique en demeurant si possible séquestrés dans le système nerveux (9, 10, 11).

Ils comprennent des composés polycycliques, naturels ou énantiomériques, éventuellement en mélanges, leurs sulfates, ou leurs dérivés lipidiques.

10

En tant que produits nouveaux, l'invention vise les produits d'addition et/ou de substitution élaborés à partir desdits composés d'une part et des protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette d'autre part.

15

L'invention vise notamment les produits de couplage stéroïdes - protéines associées - microtubules, en particulier, stéroïdes - MAP₂, le cas échéant sous forme copolymérisée à la tubuline, ou stéroïdes - protéines tau sous forme copolymérisées à la tubuline.

20

L'invention vise également l'utilisation de protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette comme récepteurs de composés tels que définis ci-dessus.

25

L'action exercée par ces composés sur la polymérisation et la stabilisation des structures du cytosquelette, comme illustré dans les exemples, leur confère un grand intérêt pour fabriquer des médicaments.

30

L'invention vise donc l'utilisation desdits composés pour fabriquer des médicaments capables de se lier

spécifiquement à des protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette à localisation cytoplasmique ou nucléaire pour le traitement de pathologies avec dysfonctionnement de ces protéines.

5

Elle vise notamment l'utilisation desdits composés pour fabriquer des médicaments pour le traitement du système nerveux, système nerveux central ou système nerveux périphérique. De tels médicaments permettent notamment de
10 stimuler la différenciation/maturation des neurones.

L'invention vise en particulier la fabrication de médicaments administrables sous forme orale, en vue du traitement du système nerveux central, ou sous forme
15 injectable, pour une administration par la voie générale ou *in situ*.

D'autres formes d'administration entrent dans le cadre de l'invention, comme les solutions retard ou les pré-drogues
20 avec conjugaison, par exemple, à un acide-gras.

Pour augmenter la biodisponibilité, il est également prévu, selon l'invention, d'utiliser les principes actifs sous forme de dérivés appropriés, tels que les esters d'acides
25 gras.

Dans ces applications, les médicaments fabriqués conformément à l'invention sont avantageusement utilisés en association avec des facteurs de croissance (NGF) et/ou des
30 régulateurs cellulaires, comme l'interféron ou les cytokines.

Des applications de grand intérêt comprennent la prévention ou le traitement d'affections telles que la maladie d'Alzheimer, les démences d'origine vasculaire, les conséquences de traumatismes et d'accidents vasculaires au
5 niveau du système nerveux et les maladies neuro-dégénératives.

L'invention vise également la fabrication de médicaments, à l'aide desdits composés, pour lutter contre le
10 vieillissement des cellules nerveuses, ou de tout autre type cellulaire contenant des MAPs, comme les cellules épithéliales, les cellules thyroïdiennes, ou des glandes endocrines, stéroïdogènes notamment.

15 Dans ces applications pour le traitement du système nerveux et du vieillissement des cellules, lesdits composés peuvent être utilisés en association avec des composés à effet stabilisateur du cytosquelette, tel que le Taxol® et le Taxotère®.

20 Dans la mesure où les deux types de molécules, composés stéroïdes ou analogues stéroïdiens ou non stéroïdiens, d'une part, Taxol® ou Taxotère® ou équivalent, d'autre part, ont un effet stabilisateur des microtubules, il est
25 possible d'envisager un phénomène de synergie si les deux médicaments sont utilisés simultanément. Dans ce cas les doses des deux médicaments requises pour une bonne efficacité seront très inférieures à celles requises lorsque les médicaments sont données en monothérapie.

30 Selon un autre aspect de grand intérêt de l'invention, les médicaments ci-dessus sont utilisables pour le traitement

de cancers, en association avec des agents anticancéreux, et permettent de moduler l'effet de ces derniers, en particulier en cas de chimio-résistance.

- 5 De telles associations avec des agents à tropisme microtubulaire sont en effet susceptibles de potentialiser les effets respectifs des produits.

Dans ces différentes applications, les composés mis en
10 oeuvre sont associés aux véhicules pharmacologiquement acceptables appropriés pour la forme galénique choisie. Les doses unitaires sont de l'ordre de 100 à 500 mg et les doses quotidiennes de l'ordre de 500 mg à 1 g pour une administration par voie générale, cette dose étant réduite
15 pour une administration *in situ*.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans la description qui suit, avec référence aux figures 1 à 7, qui se rapportent, respectivement,

20

- la figure 1, à la liaison à l'équilibre de PREG-[³H] au cytosol de cerveau foetal,

- la figure 2, à la chromatographie de cytosol de cerveau
25 foetal par FPLC sur colonne échangeuse d'ions Mono Q,

- la figure 3, à la chromatographie des pics Mono Q par FPLC sur une colonne de gel filtration Superose 12,

30 - la figure 4, à l'immunoblot du cytosol et des fractions de l'un des pics éluées des colonnes d'échange d'ions et de gel filtration,

- la figure 5, la liaison à l'équilibre de PREG [^3H] à MAP₂ purifiée, complexée ou non à de la tubuline purifiée,
- la figure 6, aux cinétiques d'assemblage de microtubules,
- 5 et
- la figure 7, à l'immunocytochimie de neurones de cerveau de rat foetal.

10 1 - Matériels et méthodes

Animaux

On utilise des rats Sprague -Dawley de l'élevage Janvier (Le Genest St Isle, France). Les rats sont soumis à une
15 alternance lumière-obscurité de 12 h (lumières à 8 h) à 20 °C et nourris à satiété.

Les femelles pleines (le matin après l'accouplement est désigné par EO) sont hébergées dans l'animalerie au moins 7
20 jours avant le sacrifice à E18. On utilise aussi des mâles adultes de 60 à 70 jours.

Les cerveaux de veau utilisés sont débarrassés de méninges et des gros vaisseaux sanguins. Ils sont conservés dans une
25 solution saline isotonique glacée.

Les animaux sont traités en conformité avec les dispositions de la Directive du Conseil de l'Union Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

Matériels- Stéroïdes :

La PREG [7-³H] (22,5 Ci/mme) utilisée est un produit
5 commercialisé par NEN (Boston, MA, EUA).

La progestérone, le sulfate de prégnénolone, la
testostérone, la corticostérone, l'acétone de
triamcinolone, la 17 α -OH PREG, la 17 α -OH progestérone et
10 le cholestérol sont des produits Sigma-Aldrich (St Quentin
Fallavier, France)

- Enzymes :

15 La protéinase K (Merck, Darmstadt Allemagne) et la Pronase[®]
(Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) sont
dissoutes à 1 mg/ml dans du tampon TNM contenant 10mM de
Tris, 0,1M de NaCl, 3mM de MgCl₂ (pH 7,4). La
déoxyribonucléase I et la ribonucléase A sont des produits
20 Sigma-Aldrich et sont ajustés, respectivement, à 100 UI/ml
et 5 UI/ml. La phospholipase A2 (Roche Molecular
Biochemicals) est diluée à 20 UI/ml dans du TNM.

- Anticorps :

25

L'anticorps monoclonal anti- α -tubuline N-356 est un produit
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Allemagne).
L'anticorps monoclonal 152 est un anticorps produit par
l'un des inventeurs qui réagit spécifiquement avec une MAP2
30 de poids moléculaire élevé.

Les différents anticorps sont dilués dans du PBS contenant 3% de BSA.

Méthodes

5 . Préparation du cytosol

On récupère des cerveaux foetaux, dont on enlève les méninges et on les soumet à un rinçage avec un tampon d'homogénéisation à 4°C [10mM de Tris-HCl, à pH 8,5
10 contenant 1,5 mM d'EDTA, 1mM de dithiothréitol, 10% de glycérol, un mélange d'inhibiteurs de protéase Complete® (Roche Molecular Biochemical), dit tampon TEDG]

Les cerveaux de rats mâles adultes sont récupérés après
15 perfusion avec du PBS contenant 2 UI/ml d'héparine. Les cerveaux sont pesés et homogénéisés avec 4 vol. de tampon d'homogénéisation, dans des homogénéiseurs Potter verre/Teflon®, et centrifugés à 800 g pendant 10 min.

20 Le surnageant est alors centrifugé à 100 000 g pendant 1 h à 4°C. Les échantillons sont utilisés immédiatement pour les essais ou sont stockés dans de l'azote liquide jusqu'au moment de leur utilisation.

25 Les concentrations en protéines sont déterminées à l'aide du kit Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Canada) avec de la BSA comme standard de référence.

. Constantes de liaison à l'équilibre

30

Juste avant l'essai de liaison, chaque échantillon est purifié avec une suspension de dextran-charbon et des

prélèvements de 2 ml de surnageant (cytosol purifié) sont ajoutés dans une série de tubes contenant la PREG [^3H] à raison de 1 à 500 nM, avec ou sans stéroïde non marqué en excès de 1000 fois.

5

Les tubes sont mis à incuber à 45°C pendant 30 min. La séparation du stéroïde lié et du stéroïde libre a été réalisée sur une minicolonne de Sephadex LH-20® (Amersham Pharmacia Biotech).

10

Le comptage de la radioactivité dans les flacons a été effectué dans un spectromètre à scintillation liquide avec correction de l'atténuation (Tri-carb 2100 TR®, Packard).

15 . Nature du composant liant la prégnénolone

1 ml de cytosol de cerveau est mis à incuber avec 0,2 ml d'une solution d'enzyme à 37°C pendant 30 min. On étudie l'activité de liaison des échantillons (0,2 ml) ayant subi le traitement enzymatique ou des échantillons témoins dilués avec le tampon seul.

20

. Essais de compétition

25 Dans les essais de compétition entre la prégnénolone et différents stéroïdes pour la liaison étudiée, on fait incuber 0,2 ml de cytosol avec 100 nM de PREG [^3H] et un excès de 1, 10, 100 et 1000 fois en stéroïde non radioactif.

30

. Chromatographie d'échange d'anions

Le système FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) a été équipé d'une colonne échangeuse d'anions (5ml Econo-Pac High Q, Bio-Rad).

La colonne a été équilibrée avec un tampon TEDG contenant 0,03% de CHAPS et 100 nM de PREG (tampon TEDGCP) à 4°C.

10 Le cytosol (20 ml, 60 mg de protéine) est appliqué et élué à une vitesse de 1 ml/min avec le tampon TEDGCP pendant 20 min.

On recueille des fractions de 2ml. On applique alors un gradient linéaire de NaCl dans TEDGCP pour atteindre une concentration de NaCl 1M après 30 min., suivi de l'application isocratique de NaCl 1 M dans un tampon TEDGCP.

20 Les fractions appropriées sont réunies ; les sels sont éliminés par passage à travers des minicolonnes de dessalage Hi Trap® (Amersham Pharmacia Biotech).

- Gel filtration

25

On équilibre la colonne Superose 12® (1 x 30 cm, Amersham Pharmacia Biotech) avec du tampon TEDGCP contenant 0,15 M de NaCl, à 4°C.

30 Le débit est ajusté à 0,25 ml/min. et on recueille des fractions de 0,4 ml.

- Contrôle de la purification des protéines

A chaque étape de purification, on incube les fractions collectées avec la PREG [^3H] 100 nM en l'absence ou avec un excès de 100 fois de PREG non radioactive. On détermine alors la liaison saturable.

- Western blots

10 Du cytosol brut et des échantillons partiellement purifiés (10 μg de protéine) sont séparés par SDS-PAGE à 10%, puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont bloquées par incubation dans 5% de lait écrémé contenant 0,1% de Tween 20[®], ajouté à un tampon
15 Tris[®] (Tris 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 8,8), pendant 1 h, à température ambiante. Tous les lavages sont effectués dans du tampon Tris contenant 0,1% de Tween 20[®] (tampon TNT). Les membranes sont ensuite mises à incuber avec des anticorps anti-tubuline (1 : 2000), ou des
20 anticorps monoclonaux anti-MAP2 (1 : 1000), à 4°C, pendant 14 h environ:

L'incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris [fragment F(ab')₂], couplé à la peroxydase, 1/10000,
25 (Pierce, Rockford, Ill., EUA) est réalisée dans un tampon TNT contenant 5% de lait, pendant 45 min., à température ambiante. Le signal est détecté par un système de chimioluminescence ECL (Amersham Pharmacia Biotech), avec un film Kodak Y-Omat, en suivant les instructions du
30 fabricant.

- Préparation des protéines de microtubules

Les cerveaux de veau sont lavés 2 fois dans un tampon L (MES 0,1 M, EGTA 1 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM, dithiothréitol 1 mM et PMSF 1 mM, pH 6,4).

On prépare les microtubules à partir de cerveau de veau ou de cerveau de rat adulte ou foetal selon un procédé d'assemblage/ désassemblage, en fonction de la température, *in vitro* (12).

La tubuline de veau est purifiée selon le protocole de Weingarten et al (13), mais l'étape utilisant la phosphocellulose est remplacée par une chromatographie sur colonne d'échange de cations (Fractogel Merck) (14). Les microtubules et la tubuline sont préparés dans le tampon L, supplémenté par 1 mM de GTP (tampon A).

Les protéines tau et MAP₂ sont purifiées selon le protocole de Fellous et al (12) par dénaturation des microtubules par la chaleur et gel filtration sur colonne, le Séphacryl 300[®] étant utilisé à la place de l'Ultrogel ACA 34. Les protéines tau sont ensuite encore purifiées selon la méthode de Lindwall et Cole (15).

25

- Mesure de l'assemblage des microtubules

Cet assemblage est mesuré en contrôlant les augmentations de turbidité avec un spectrophotomètre UVICON[®] (Kontron Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France).

30

- Culture des neurones

On procède à des cultures primaires de neurones de fœtus E17 selon El-Etr et al (16). Brièvement, cette méthode
5 consiste à étaler les cellules dissociées (200 000 cellules/cm²) sur des lamelles de verre recouvertes de poly-l-ornithine et mises en culture dans un milieu complètement défini dans 5% de CO₂ à 37°C. Les conditions
10 de culture utilisées permettent d'obtenir une population neuronale pratiquement pure.

24 h après l'ensemencement, on ajoute de la prégnénolone 1 micromolaire (concentration finale d'éthanol 0,01%) ou le solvant seul et on poursuit les cultures pendant 2 jours.
15 Les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4%, puis congelées à -80°C. En temps utile, elles sont réhydratées par des passages de 5 min dans de l'éthanol à des concentrations de 100, 90 et 70%. Après 2 lavages dans du PBS, pendant 5 min, les cellules sont incubées dans du
20 PBS contenant 3% de BSA et 0,1% de Triton X100, à température ambiante, pendant 1 h.

Après 4 lavages dans du PBS, les cellules sont mises à incuber à 37°C pendant 1 h, puis à 4°C pendant environ 14
25 h, en présence soit d'anticorps monoclonal anti- α -tubuline dilué à 1/2000 ou d'anticorps monoclonal anti-MAP2 dilué à 1/1000 ou d'antisérum anti-double cortine dilué à 1/300.

Après 3 lavages dans du PBS, on ajoute l'anticorps
30 secondaire à température ambiante, pendant 45 min. Il s'agit soit d'IgG de lapin [fragment F(ab')₂] anti-Ig de souris conjugué à de la biotine, dilué à 1/350 (Roche Molecular

Biochemicals) ou d'IgG anti-lapin biotinylée, diluée à 1/300 (Boehringer).

Après 3 lavages, le complexe d'amplification peroxydase-streptavidine (Dako, Danemark) est ajouté pendant 30 min à température ambiante.

Les cellules sont lavées et le substrat AEC (amino-éthyl-carbazole, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est déposé sur les cellules pendant 15 min. La réaction est arrêtée par addition d'eau distillée. Les cellules sont contre colorées avec de l'hématoxyline et montées sur Glycergel®.

15 - Microscopie électronique

Après polymérisation des microtubules induite par MAP₂ en l'absence ou en présence de la substance à tester, une partie aliquote de l'échantillon expérimental est déposée sur une grille hydrophile (300 mesh) revêtue de carbone. Les grilles sont traitées par une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 1%. Les observations sont effectués avec un microscope électronique Philips CM12.

25 - Analyses statistiques

Les données de liaison à l'équilibre sont analysées avec le programme Mac Ligand, adapté de Munson et Rodbard (17). Les courbes sont tracées avec le logiciel kaléidograph TM 3.0 (Abelbeck software, Ritme Informatique, Paris).

2 - Résultats

Sites de liaison de la prégénolone dans le cerveau de rat.

5 Les échantillons de cytosol (0,2 ml, 2,5 mg de protéine/ml), préalablement déstéroïdés par adsorption sur charbon/dextran, sont mis à incuber avec des concentrations croissantes en PREG [³H] dans un tampon TEDG à pH 8,5, à 40°C, pendant 30 min.

10

Le stéroïde lié est séparé par gel filtration sur Séphadex LH20® à 0-4°C. Les constantes de liaison sont déterminées avec le programme Mac Ligand.

15 La figure 1 représente un diagramme de Scatchard de la liaison spécifique.

On observe une constante Kd de $31,0 \pm 0,8$ nM et une concentration maximale des sites de liaison (Bmax) de $1,2 \pm 0,1$ pmol/mg de protéine (moyenne \pm erreur - type, n=3).

20

Pour étudier les effets d'enzymes hydrolytiques sur la liaison de la PREG [³H], on a utilisé des échantillons de 1 ml de cytosol incubés avec 0,2ml d'une solution d'enzyme, à 37°C, pendant 30 min. Les résultats obtenus, exprimés en % de l'incubation témoin (cytosol dilué dans du tampon) sont rapportés dans le tableau 1 (moyenne \pm écart - type (n-3)).

25

TABLEAU 1

Enzyme	Concentration/ml	% de témoin
Protéinase K	0,17 mg	42,2 ± 7,5
Pronase	0,17 mg	40,5 ± 5,7
Déoxyribonucléase 1	17 UI	99,4 ± 12,7
Ribonucléase A	0,8 UI	82,4 ± 9,2
Phospholipase A2	33 UI	85,0 ± 7,3

On constate que les sites de liaison de la PREG [³H] sont
5 détruits à raison d'environ 60% par la protéinase K et la
Pronase^R. Au contraire, on n'observe pas d'effet
significatif avec la DNAase, la RNAase et la phospholipase
A2.

10 Pour étudier la spécificité de la liaison de la PREG [³H],
différents stéroïdes ont été utilisés.

On a déterminé les index de compétition relative en tant
que rapports des concentrations du compétiteur (en
15 dénominateur) versus PREG entraînant une diminution de 50%
de la liaison spécifique de PREG [³H] x 100 (moyenne ±
écart - type, n = 3). Les résultats sont donnés dans le
tableau 2.

TABLEAU 2

Stéroïdes	R.C.R 50
Prégnénolone	100
Sulfate de prégnénolone	78,8 ± 7,0
Progestérone	72,1 ± 17,7
Δ^5 -Prégnène-3 β ,20 α -diol	68,4 ± 15,3
3 β -hydroxy-5 α -prégnane 20-one	18,4 ± 4,0
Testostérone	5,6 ± 2,8
Déhydroépiandrosterone	4,3 ± 2,6
Estrone	4,4
Corticostérone	2,8
Androstènediol	1,7
Estradiol	1,3
Acétonide de triamcinolone	1
17 α -hydroxy-prégnénolone	0,85
17 α -hydroxy-progestérone	0,79
Sulfate de DHEA	0,045
Cholestérol	0,02

On constate que les meilleurs compétiteurs pour la liaison
 5 de PREG [^3H] sont le sulfate de prégnénolone, la
 progestérone, et le Δ^5 -prégnène-3 β , 20 α -diol (20 α -dihydro-
 prégnénolone).

Un autre stéroïde, possédant une structure similaire à la
 10 PREG, à savoir la 3 β -hydroxy-5 α -prégnane-20-one (5 α -
 dihydro-PREG) se révèle également un compétiteur efficace,
 bien que 5 fois moins actif que PREG.

Parmi les autres stéroïdes testés, la DHEA est un faible compétiteur et le sulfate de DHEA a un effet pratiquement négligeable.

- 5 Les structures préférées sont des stéroïdes en C-21 avec un groupe cétone ou un groupe alcool en positions 3 et 20 et un cycle A ou B insaturé conférant une structure plus plane au squelette du stéroïde.

- 10 D'autres essais réalisés avec des cerveaux de rat adulte donnent des résultats du même ordre, montrant que le cerveau contient un composant liant la PREG, avec des constantes de liaison similaires à celles du cerveau foetal ($K_d = 50,7$ nM, $B_{max} = 0,75$ pmol/mg de protéine).

- 15 Purification de la protéine de liaison du cytosol
. Chromatographie sur colonne Mono Q®

- 20 Les sites de liaison de la prégnénolone sont élués à l'aide d'une colonne échangeuse d'ions Mono Q®. 60 mg de protéines cytosoliques dans un tampon TEDGCP sont chargés sur la colonne et élués avec un gradient de NaCl. On recueille des fractions de 2 ml. On rapporte sur la figure 2 la liaison saturable de PREG [3H] PREG (dpm $\times 10^{-4}$) (-o-) et la concentration de protéines (mg/ml) (---◇---) dans chaque
- 25 fraction.

- Les fractions du pic A (fractions 17 à 19 : 4,5 mg de protéine) et celles du pic B (fractions 23 à 25 : 1,1 mg de protéine) sont réunies séparément. Les sels des 2 fractions
- 30 sont éliminés et les fractions sont concentrées et soumises à une gel filtration.

. Chromatographie sur Superose 12®

Les pics A et B sont filtrés sur une colonne Superose 12® (élution avec le tampon TEDGCP contenant 0,15 M de NaCl).

5

On recueille des fractions de 0,4 ml. On mesure la liaison spécifique de PREG [³H] sur chaque fraction de la colonne calibrée avec des marqueurs de poids nucléaire. On rapporte les résultats obtenus sur la figure 3 qui donne, pour
10 chaque fraction, la liaison saturable de PREG [³H] (-o-) en dpm x 10⁻⁴ et la concentration des protéines en mg/ml (---Δ---). On note la présence de 2 pics de 40-60 kDa (fraction A) et de plus de 440 kDa (fraction B).

15 La présence d'un composant à très haut poids moléculaire suggère que la protéine de liaison du cytosol pourrait être une protéine de très haut moléculaire associée aux microtubules, qui sont des constituants majeurs du cytoplasme neuronal.

20

Il convenait de vérifier la présence dans la fraction A de composants du système microtubulaire. A cet effet les pics de liaison de la PREG ont été soumis à une SDS-PAGE, suivie d'un immunoblot. On rapporte sur la figure 4 l'immunoblot
25 du cytosol et des fractions du pic A éluées des colonnes d'échange d'ions et repassées sur colonne de gel filtration. La piste 1 correspond au cytosol brut ; la piste 2 à la fraction A Mono Q® ; la piste 3 à la fraction A soumise à une nouvelle chromatographie sur Superose 12®.

30

10 µg de protéine sont déposés sur les pistes 1 et 2. La quantité de protéine dans la piste 3 est inférieure au seuil de détection.

- 5 On constate que les protéines qui réagissent immunologiquement avec les anticorps anti-MAP2 et anti-tubuline (α et β) ont été enrichies dans ces préparations partiellement purifiées, et ce en proportion compatible avec l'augmentation d'activité de liaison spécifique. Le
- 10 faible poids moléculaire des polypeptides reconnus par les anticorps anti-MAP₂ suggère que des cassures de la (des) protéine(s) MAP₂ de 300 (ou 70) Kd se sont produites durant la purification de la protéine cytosolique.

- 15 Liaison de PREG [³H] à des microtubules de cerveau de rat purifié.

On a déterminé la liaison de la PREG [³H] aux microtubules préparés par des cycles de polymérisation/dépolymérisation.

- 20 Les microtubules foetaux ont une constante Kd pour PREG [³H] de 42,9 nM et une Bmax de 3,7 pmol/mg de protéine, ce qui représente un enrichissement de 3 fois par rapport au cytosol de cerveau foetal.

- 25 La spécificité du ligand apparaît inchangée [RCR : PREG(100) > PREGS (78,8) > PROG (72,1) >> Testostérone (5,6) > DHEA (4,3) > estradiol (1,3)].

- 30 Les microtubules adultes ont une constante Kd pour PREG [³H] de 54,8 nM et une Bmax de 3,4 pmol/mg de protéine, ce

qui représente un enrichissement de 4,5 fois comparé au cytosol de cerveau adulte.

5 Activités de liaison de la prégnénolone à MAP₂, à la tubuline et à la protéine tau purifiées.

On fait incuber de la tubuline de cerveau de veau purifiée (90 µg/ml), de la MAP₂ (45 µg/ml) ou de la protéine tau (25 µg/ml) avec PREG [³H] 100nM sans ou avec un excès de
10 1000 fois de PREG non radioactive.

On constate que ni la tubuline, ni la protéine tau, ni l'IgG de lapin ne lient PREG [³H] d'une manière saturable.

15 Au contraire, la fraction MAP₂ montre des sites de liaison spécifiques qui augmentent lorsqu'on procède à une co-incubation avec de la tubuline.

Les constantes de liaison à l'équilibre de MAP₂ de veau purifiée sont les suivants : Kd=39,2 nM, Bmax=16pmol/mg
20 de MAP₂ alors que celles des copolymères MAP₂-tubuline sont : Kd=44,0 nM, Bmax=135 pmol/mg de MAP₂.

Il apparaît donc que la liaison de MAP₂ à la tubuline ne
25 modifie par l'affinité de la PREG, mais augmente au contraire la concentration des sites de liaison de plus de 8 fois.

Sur la figure 5, on rapporte les valeurs B/U en fonction de
30 B en nM, (-o-) représentant la liaison à l'équilibre de MAP₂ de cerveau de veau purifiée et (-o-), la liaison à l'équilibre de MAP₂ de cerveau de veau purifiée associée à

de la tubuline purifiée de cerveau de veau (pour les détails expérimentaux, voir la figure 1).

La concentration molaire des sites de liaison est de 14 nM et celle de MAP₂, en se basant sur un PM moyen de 200 000, d'environ 200 nM.

On constate donc que moins de 10% des molécules de MAP₂ peuvent se lier à PREG [³H].

10

Le remplacement du tampon A par le tampon TEDG n'influe pas sur les constantes de liaison de la prégnénolone à l'équilibre.

15 La spécificité de liaison des stéroïdes aux copolymères de MAP2-tubuline est très proche de celle des microtubules foetaux [RCR : PREG (100) > PREGS (91,5) > PROG (81,3) >> estradiol (3,2) > Testostérone et DHEA (2,3)].

20 Effets des stéroïdes sur les cinétiques d'assemblage des microtubules

Les microtubules sont reconstitués *in vitro* avec de la tubuline purifiée (1 mg/ml) et MAP2 (0,05 mg/ml) dans du
25 tampon A.

L'augmentation d'absorbance est mesurée à 345 nm, à 37°C et enregistrée toutes les 30 sec. pendant 15 min.

30 Les résultats sont donnés sur la figure 6.

L'assemblage des microtubules est mesuré soit en l'absence de stéroïdes (-○-), soit en présence de 500 nM de stéroïde : PREG (- -), progestérone (-X-), estradiol (-▽-), soit en présence à la fois de PREG et de progestérone (-o-) ou
5 de PREG et d'estradiol (-Δ-), chacun à une concentration de 500 nM.

L'augmentation de l'absorbance à 345 nM montre que la PREG induit une forte augmentation à la fois de la vitesse et de
10 l'étendue de l'assemblage de la tubuline. L'estradiol, qui ne se lie pas à MAP₂, est inactif. Cependant, la progestérone, qui montre une affinité pour MAP₂ du même ordre que celle de la PREG, est également sans effet. Contrairement à l'estradiol, elle contrecarre l'effet
15 stimulateur de la PREG sur l'assemblage des microtubules. Le sulfate de PREG a des effets semblables à celles de la progestérone.

Analyse par microscopie électronique

20

On a procédé à l'analyse des microtubules polymérisés, en présence de PREG pour vérifier leur aspect.

En présence de MAP₂ de cerveau de veau, la tubuline de
25 cerveau de veau s'assemble en microtubules d'apparence normale, c'est-à-dire caractérisés par une conformation remarquablement constante et un diamètre uniforme. La structure des microtubules reste complètement normale lorsque MAP₂ induit la polymérisation de tubuline en
30 présence de 500 nM de PREG.

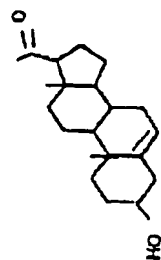
Effets de la prégnénolone sur les cultures neuronales

On étudie les neurones de cerveau de rat foetaux par immunocytochimie après 3 jours de culture. Les résultats
5 sont donnés sur la figure 7 où A, C, E correspondent à une culture témoin de 3 jours, B, D, F,   l'addition de prégnénolone 1 μ M les 2 derniers jours de culture. Dans A et B, on ajoute un anticorps monoclonal anti α -tubuline, dans C et D, un anticorps polyclonal anti-doublecortine et
10 dans E et F, un anticorps monoclonal anti-MAP₂.

La coloration avec les anticorps monoclonaux anti- α tubuline ou anti-doublecortine ne montre aucune différence entre les cultures témoins et les cultures exposées à de la
15 prégnénolone 1 μ M pendant 2 jours. Au contraire, l'exposition à la prégnénolone augmente l'immunomarquage de MAP₂ des corps cellulaires et induit son extension aux neurites proches (voir les flèches).

20 Etude de la capacité compétition de divers composés avec la prégnénolone

On rapporte dans le tableau ci-après les résultats obtenus avec 11 dérivés de st ro ides.



**Pregnenolone
(100%)**

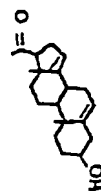
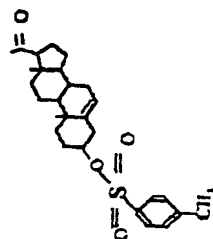
Composés à Grande Capacité Compétitrice	Indice de Compétition		
	Cytosol (Rat)	MT (Bœuf)	MAP-2c + Tubuline

PREG Tosylate

107

121

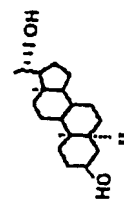
129



3β-OH-5, 14 Pregnadiène-20-one

102

95

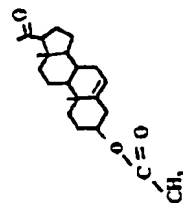
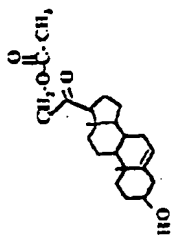
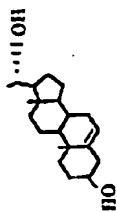


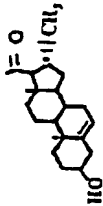
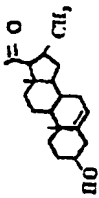
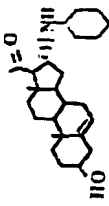
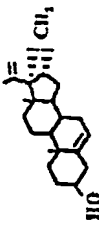
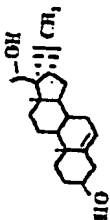
5α-Pregname 3β, 20α-diol

100

96

Composés à Grande Capacité Compétitrice	Indice de Compétition		
	Cytosol (Rat)	MT (Bœuf)	MAP-2c + Tubuline
Pregna-5-ène-3β, 20α-diol	87	100 (Bœuf)	
3β-OH-Pregna-5-ène-20-one-21- acétoxy	80	107	
(Sigma)			(Porcelet)
PREG-acétate	79		



Composés à Grande Capacité Compétitrice	Indice de Compétition		
	Cytosol (Rat)	MT (Bœuf)	MAP-2C + Tubuline
 PREG-16α-méthyl	80	88	
 PREG-16β-méthyl	63	(bœuf) 83	97
 PREG-16α-cyclohexylamine	59	81 (Porcelet)	
 Prégna-16α-17α-méthylène	62	59	
 Prégna-5-ène-3β, 20β-diol- 16α, 17α-méthylène	54		

Les résultats montrent que les stéroïdes testés se lient au même site que la PREG sur les protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - WOLOSEWICK, J.J. et PORTER, K.R. (1979). J Cell Biol 82, 114-139
- 2 - GRIFFITH, L.H. et POLLARD, T (1982) J. Biol Chem. 257, 9143-9151
- 5 3 - CORREAS, L. et al J. (1990) Biochem. J, 269, 61-64
- 4 - AAMODT, E.J. et WILLIAMS, J.R. R.C. (1984) Biochemistry. 23, 6023-6031
- 5 - HIROKAWA, N. (1982) / J. Cell. Biol. 94, 129-142
- 6 - LUDUENA, R.F. (1998) Intern. Revi Cytolo 178, 207-275
- 10 7 - VIERICK, C. et al (1989) J. Neurosci. 9, 3547-3557
- 8 - TUCKER, R.P. et al (1988) Dev. Biol. 130, 423-434
- 9 - BODOR N. et al (1983), J. Med. Chem. 26, 313-318
- 10 - BODOR N. et al, (1984) J. of Pharm. Sciences vol.73, n°3
- 11 - PARTDRIDGE W. M. et al, 1979 J. Clin. Invest., vol. 64, 145-154,
- 15 12 - FELLOUS A. et al (1977) Eur. J. Biochem. 78, 167-174
- 13 - WEINGARTEN M. D. et al / Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1975) 72, 1848-1852
- 14 - FROMES Y. et al J. Protein Chem. (1996) 15, 377-388
- 20 15 - LINDWALL G. et al (1984) J. Biol. Chem. 259, 12241-12245
- 16 - El Etr M. et al (1989) J. Neurosci. 9, 1473-1480
- 17 - Munson PJ et Rodbard D (1980) Anal. Biochem. 107, 220-239

REVENDICATIONS

1/ Composés non toxiques, capables de passer la barrière hémato-encéphalique caractérisés en ce qu'ils sont capables de lier le même site que la prégnénolone sur les protéines constituan-tes ou associées aux éléments du cytosquelette et de
5 déplacer la prégnénolone liée à MAP₂, ainsi que d'influer sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules.

2/ Produits d'addition élaborés à partir des composés selon la revendication 1 ou de stéroïdes d'une part, et des protéines
10 constituan-tes ou associées aux éléments du cytosquelette d'autre part.

3/ Produits d'addition selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'il s'agit de stéroïdes - protéines associées -
15 microtubules, notamment de stéroïdes - MAP₂, le cas échéant sous forme copolymérisée à la tubuline, ou de stéroïdes - protéines tau sous forme copolymérisées à la tubuline.

4/ Utilisation de protéines constituan-tes ou associées aux
20 éléments du cytosquelette comme récepteurs de stéroïdes ou de composés selon la revendication 1.

5/ Utilisation de stéroïdes ou de composés selon la revendication 1, pour la fabrication de médicaments pour le
25 traitement de pathologies impliquant les protéines constituan-tes ou associées aux éléments du cytosquelette.

6/ Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que le stéroïde est la prégnénolone ou son sulfate.

7/ Utilisation selon la revendication 5 ou 6, pour fabriquer des médicaments pour le traitement du système nerveux, système nerveux central ou système nerveux périphérique.

5 8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que les médicaments se présentent sous forme orale en vue du traitement du système nerveux, ou sous forme injectable, pour une administration par la voie générale ou *in situ*, ou encore sous forme de solutions retard ou de pré-drogues avec
10 conjugaison, par exemple, à un acide gras.

9/ Utilisation selon la revendication 7 ou 8 pour fabriquer des médicaments pour la prévention ou le traitement
15 d'affections telles que la maladie d'Alzheimer, les démences d'origine vasculaire, les conséquences de traumatismes et d'accidents vasculaires au niveau du système nerveux et les maladies neuro-dégénératives.

10/ Utilisation selon la revendication 5 ou 6, pour fabriquer
20 des médicaments pour lutter contre le vieillissement des cellules nerveuses, ou de toute autre type cellulaire contenant des MAPs, comme les cellules épithéliales, les cellules thyroïdiennes, ou des glandes endocrines.

25 11/ Utilisation selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 en association avec des composés à effet stabilisateur du cytosquelette, tel que le Taxol®.

12/ Utilisation selon la revendication 5 ou 6, pour fabriquer
30 des médicaments pour le traitement de cancers, en association avec des agents anticancéreux.

1/7

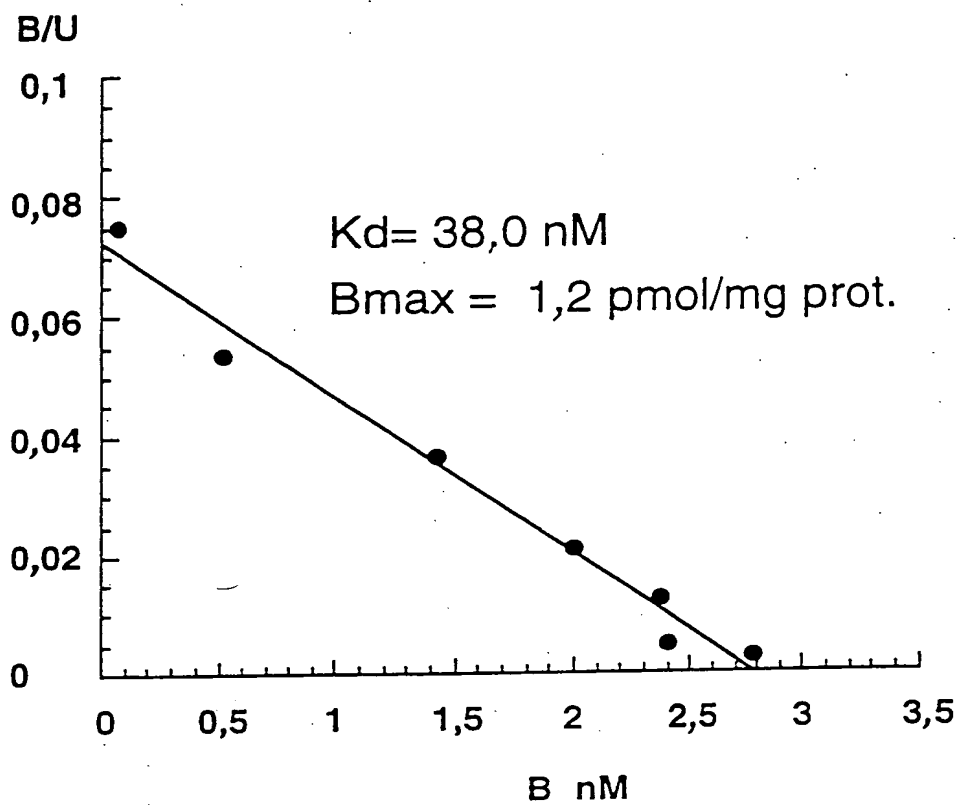


Fig. 1

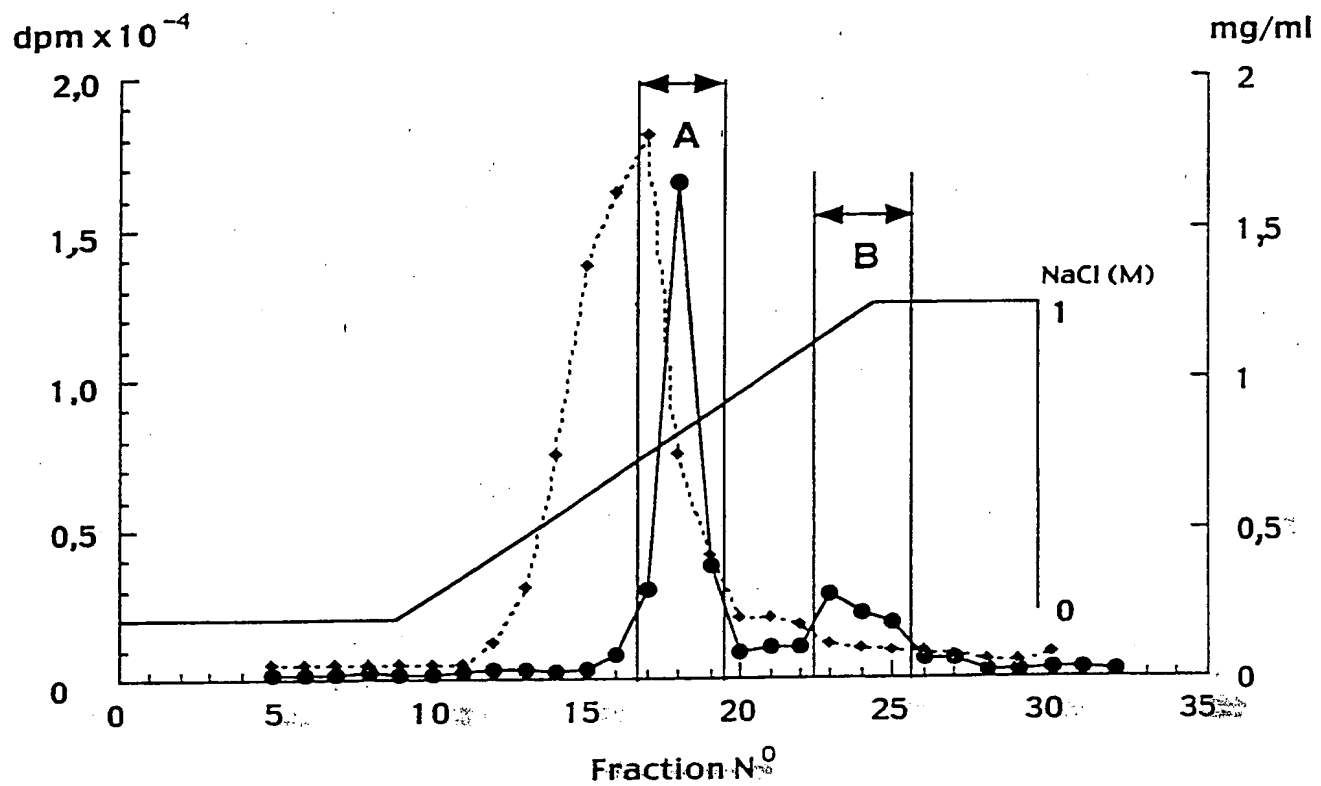


Fig. 2

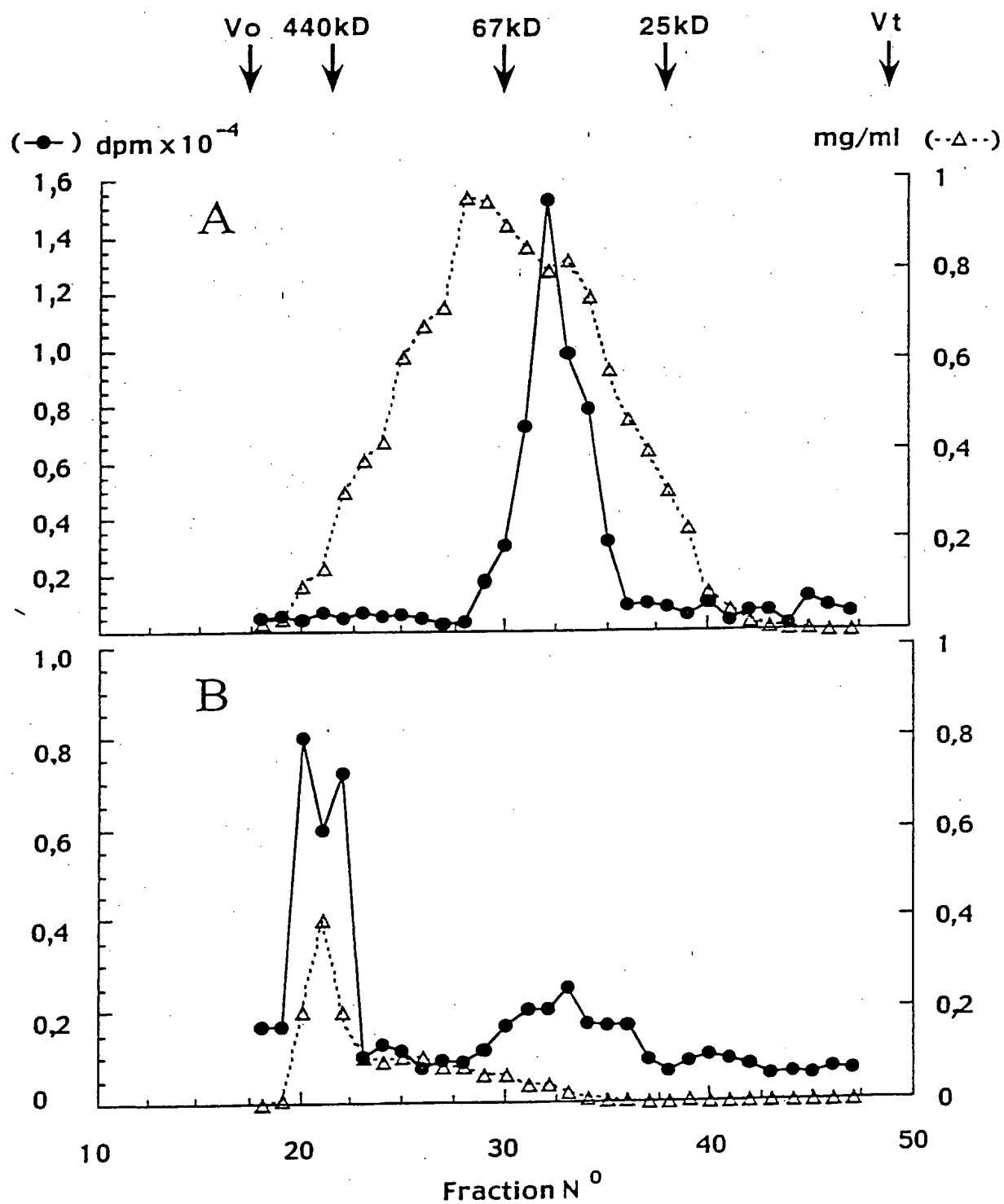


Fig. 3

4 / 7

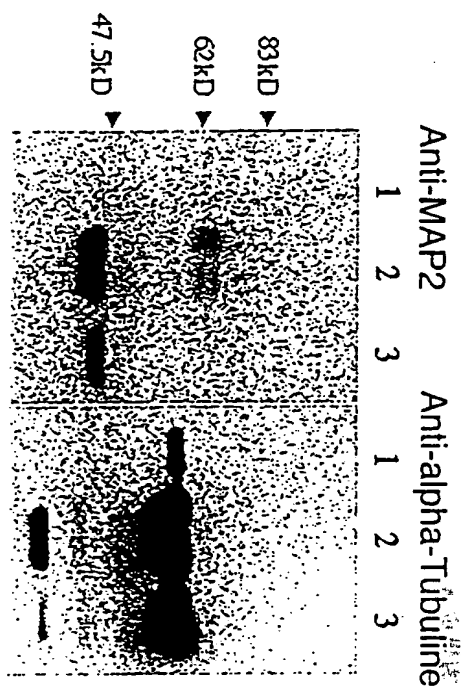


Fig. 4

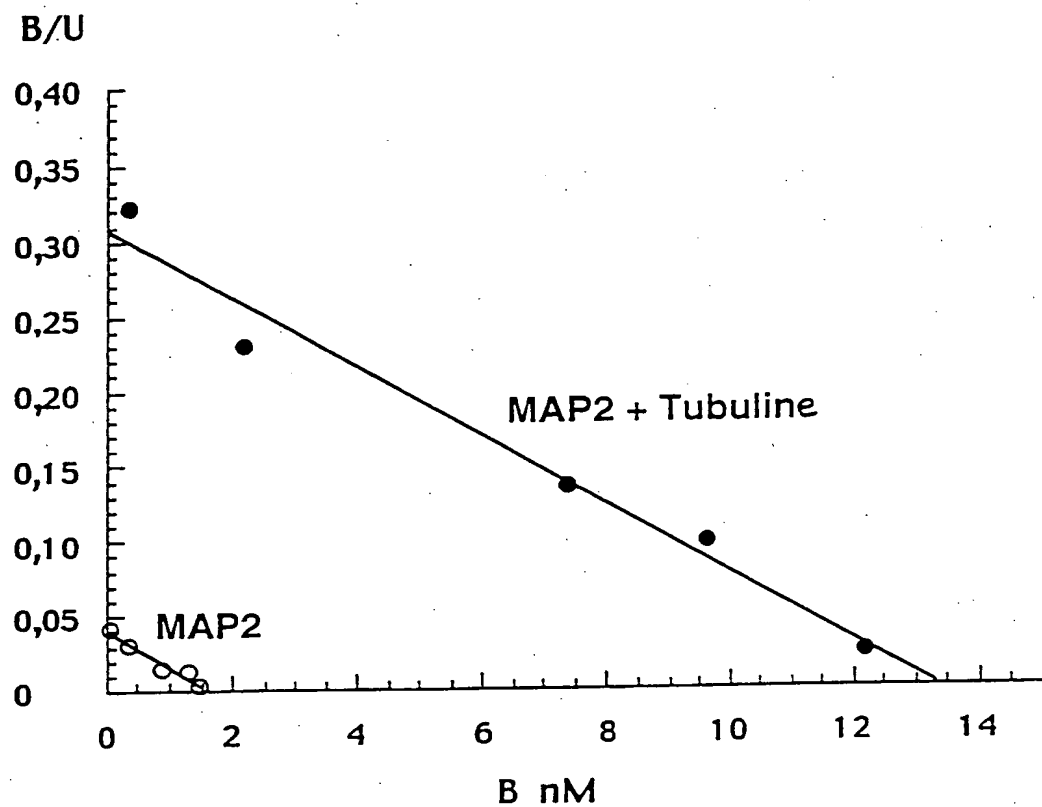


Fig. 5

6/7

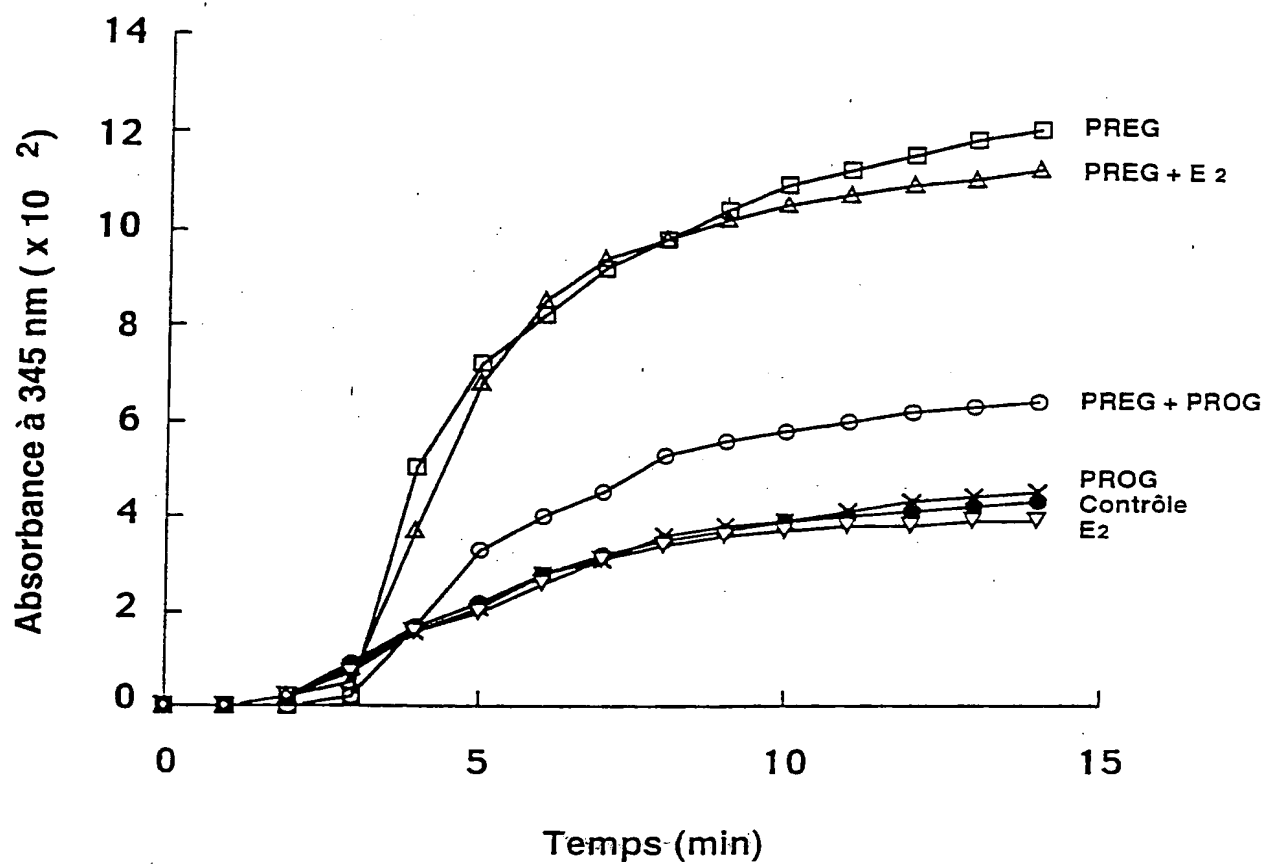


Fig. 6

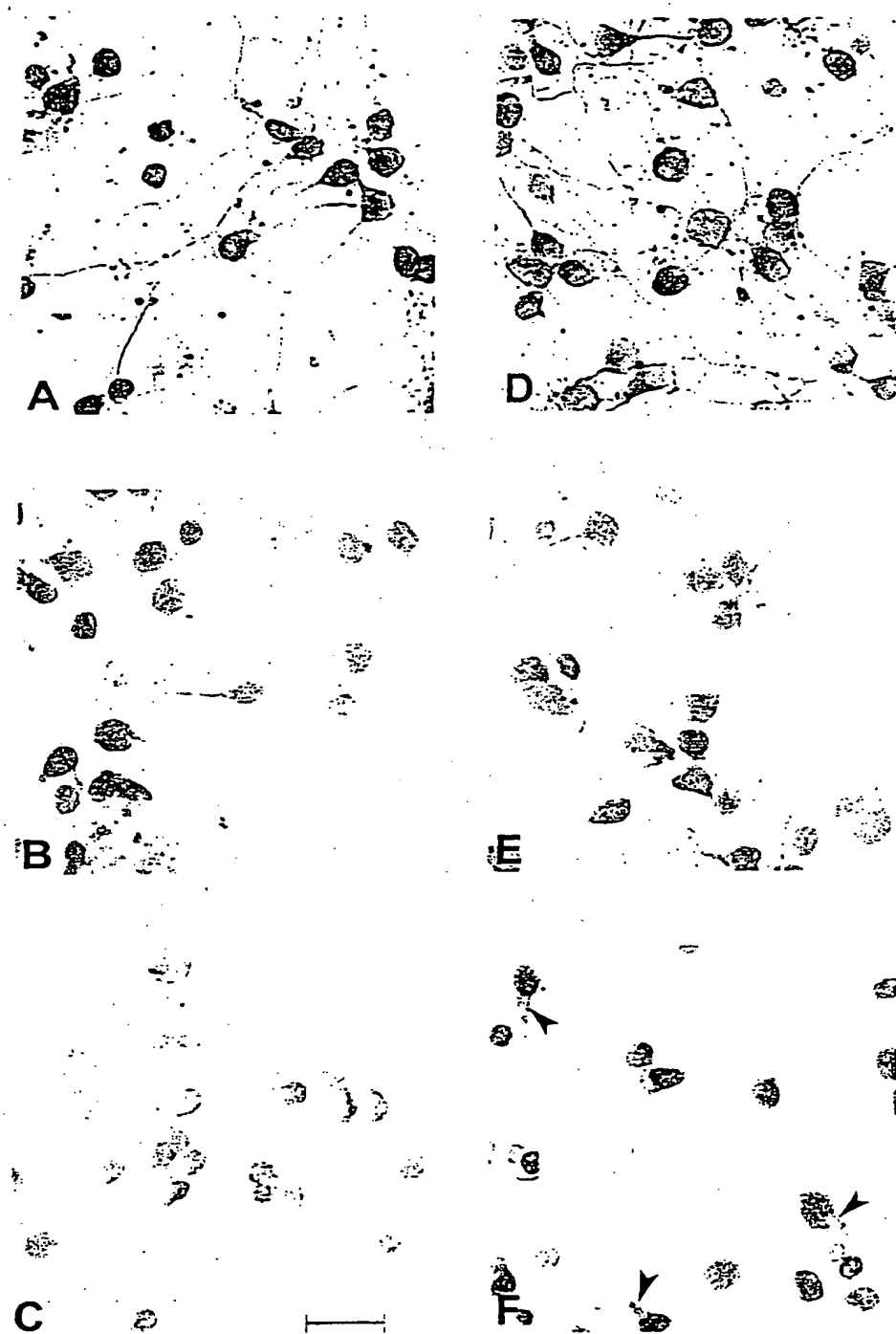


Fig.7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 septembre 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/68068 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/00, 31/57, 47/48, A61P 25/00, 25/28,
35/00, 43/00, 5/00 // A61K 31/335, 31:57

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00816

(22) Date de dépôt international : 19 mars 2001 (19.03.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/03430 17 mars 2000 (17.03.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BAULIEU,
Etienne-Emile [FR/FR]; 16, rue Berteaux Dumas,
F-92200 Neuilly sur Seine (FR). ROBEL, Paul [FR/FR];
36, rue Santos Dumont, F-75015 Paris (FR). FELLOUS,
Esther [FR/FR]; 3, rue Gracieuse, F-75005 Paris (FR).
MURAKAMI, Koichi [JP/JP]; 7-7 Tenjinchachi 2-chome,
Kanazawa 920 (JP).

(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 20 juin 2002

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOUNDS CAPABLE OF BINDING WITH THE CYTOSKELETON

(54) Titre : COMPOSES SE LIANT AU CYTOSQUELETTE

(57) Abstract: The invention concerns the use of steroids and non-toxic compounds, capable of crossing the blood brain barrier characterised in that they are capable of binding the same site as pregnenolone on proteins constituting or associated with elements of the cytoskeleton and of displacing the MAP-bound pregnenolone, and of influencing the assembling and stabilisation of microtubules. The invention is particularly useful for treating the nervous system, for fighting against ageing of cells containing MAP₂, and for treating cancers.

(57) Abrégé : L'invention vise l'utilisation de stéroïdes et de composés non toxiques, capables de passer la barrière hémato-encéphalique caractérisés en ce qu'ils sont capables de lier le même site que la prégnénolone sur les protéines constitutives ou associées aux éléments du cytosquelette et de déplacer la prégnénolone liée à MAP₂, ainsi que d'influer sur l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Application, notamment, au traitement du système nerveux, pour lutter contre le vieillissement des cellules contenant des MAP₂, et pour le traitement de cancers.

WO 01/68068 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 01/00816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/00 A61K31/57 A61K47/48 A61P25/00 A61P25/28
 A61P35/00 A61P43/00 A61P5/00 //A61K31/335,31:57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 11814 A (BOARD OF TRUSTEES OF LELAND STANFORD UNIVERSITY) 11 March 1999 (11.03.99) the whole document, but especially the abstract, pages 3-7, page 9, lines 3-9, page 10, page 11, lines 24-32, page 12, lines 1-13, pages 22-24, page 30, line 27, example 3 and claims 41, 59-6	2-5, 10
Y	----- -/--	12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 2001

Date of mailing of the international search report

03/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCI/FR 01/00816

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 64013 A (STREIX LIMITED) 16 December 1999 (1999-12-16) page 3, line 25 - line 32 page 4, line 1 - line 10 page 5 page 7, line 11 - line 15 page 11 -page 14 page 17, line 24 - line 32 page 18 -page 20 pages 36-41, especially page 38, line 32, page 40, line 32 and page 41, lines 1 and 7	5,7-9, 11,12
X	AKNER, GUNNAR ET AL: "Glucocorticoid receptor inhibits microtubule assembly in vitro" MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1995, 110, 49-54, XP000989536 the whole document, especially page 51 table I (I.A), page 52 right-hand column, page 53, paragraphes 4.1 and 4.2	4,5
X	GETZENBERG R H ET AL: "THE TISSUE MATRIX CELL DYNAMICS AND HORMONE ACTION" ENDOCR REV, 1990, XP000989539 page 403, left-hand column, last paragraph page 404, left-hand column, paragraph 2	5
A	---	4
X	VERDIER-PINARD, PASCAL ET AL: "A steroid derivative with paclitaxel-like effects on tubulin polymerization" MOL. PHARMACOL., MARCH 2000, 57, 568-575, XP000989650 (mailing for this issue has been completed on 21-12-1999)	5
A	the whole document	11,12
Y	AEBI S. ET AL: "A phase II/pharmacokinetic trial of high-dose progesterone in combination with paclitaxel" CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY_(CANCER CHEMOTHER. PHARMACOL.), 1999, 44/3 (259-265), XP000989537 Germany the whole document	12
A	---	5,11

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCI/FR 01/00816

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NISHIO K ET AL: "ENHANCED INTERACTION BETWEEN TUBULIN AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2 VIA INHIBITION OF MAP KINASE AND CDC2 KINASE BY PACLITAXEL" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 63, no. 5, 1995, pages 688-693, XP000909268 ISSN: 0020-7136 abstract	11
P, X	BAULIEU E E: "'NEW' ACTIVE STEROIDS AND AN UNFORESEEN MECHANISM OF ACTION RESUME - DE NOUVELLES ACTIVITES STEROIDES UN MECANISME D'ACTION INATTENDU" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 323, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 513-518, XP000982545 ISSN: 0764-4469 the whole document	1-7, 9, 10
P, X	MURAKAMI K ET AL: "PREGNENOLONE BINDS TO MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2 AND STIMULATES MICROTUBULE ASSEMBLY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 97, no. 7, 28 March 2000 (2000-03-28), pages 3579-3584, XP000982542 ISSN: 0027-8424 the whole document	2-4
Y		5-8, 11, 12
A	NUNEZ J: "MICROTUBULES AND BRAIN DEVELOPMENT: THE EFFECTS OF THYROID HORMONES" NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 7, no. 6, 1985, pages 959-968, XP000989637 ISSN: 0197-0186 the whole document	5, 7, 10
P, X	WO 00 26229 A (TEIKOKU HOEMOME MFG CO LTD) 11 May 2000 (2000-05-11) abstract & AU 62282 99 A 22 May 2000 (2000-05-22)	5

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 01/00816

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	<p>WO 00 71563 A (UNIVERSITY OF HAWAII)</p> <p>30 November 2000 (2000-11-30)</p> <p>abstract</p> <p>page 5, line 30 - line 32</p> <p>page 6, line 1 - line 6</p> <p>page 12 -page 14</p> <p>page 17</p> <p>page 26; example 15</p> <p>claims 15-20</p> <p>-----</p>	<p>5-8, 11,</p> <p>12</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00816

Continuation of Box I.2

Claims 1-5, 12 of the present application concern a very wide variety of compounds (Claims 2-5, and 12) and/or compounds defined by referring to one or some desirable characteristics or properties (Claim 1). The expressions "constituting proteins or proteins associated with the cytoskeleton elements", "non-toxic compounds" or "steroids" (Claims 2-5, 12) contain so many options, variables, possible permutations and Claim 1 covers so many products that the resulting lack of clarity (and/or conciseness) as defined by PCT Article 6 is such that it is not possible to carry out any meaningful search on the subject matter of the claims.

Consequently, the search was carried out for those parts of the application which appear to be clear (and/or concise), supported and sufficiently disclosed, that is on the compounds mentioned at page 13, lines 7-12 and the (illustrated) pregenolone.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following reception of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/00816

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9911814	A	11-03-1999	AU 9301898 A EP 1009853 A1 WO 9911814 A1	22-03-1999 21-06-2000 11-03-1999
WO 9964013	A	16-12-1999	AU 4280799 A EP 1085876 A1 WO 9964013 A1	30-12-1999 28-03-2001 16-12-1999
WO 0026229	A	11-05-2000	AU 6228299 A WO 0026229 A1	22-05-2000 11-05-2000
WO 0071563	A	30-11-2000	AU 5276300 A WO 0071563 A2	12-12-2000 30-11-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der de Internationale No

PC/FR 01/00816

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K31/00 A61K31/57 A61K47/48 A61P25/00 A61P25/28
A61P35/00 A61P43/00 A61P5/00 //A61K31/335,31:57

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C07J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 11814 A (BOARD OF TRUSTEES OF LELAND STANFORD UNIVERSITY) 11 mars 1999 (1999-03-11) document en entier, mais surtout le résumé, pages 3-7; page 9 lignes 3-9, page 10, page 11 lignes 24-32, page 12, lignes 1-13, pages 22-24, page 30 ligne 27, exemple 3, et revendications 41,59-6	2-5,10
Y	---	12

	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

G document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 novembre 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/12/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gac, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der de Internationale No

PLI/FR 01/00816

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 64013 A (STREIX LIMITED) 16 décembre 1999 (1999-12-16) page 3, ligne 25 - ligne 32 page 4, ligne 1 - ligne 10 page 5 page 7, ligne 11 - ligne 15 page 11 -page 14 page 17, ligne 24 - ligne 32 page 18 -page 20 pages 36-41, surtout page 38 ligne 32, page 40 ligne 32 et page 41 lignes 1 et 7 ----	5,7-9, 11,12
X	AKNER, GUNNAR ET AL: "Glucocorticoid receptor inhibits microtubule assembly in vitro" MOL. CELL. ENDOCRINOL., 1995, 110, 49-54, XP000989536 document en entier, surtout page 51 Tableau I (I.A), page 52 colonne de droite, page 53 paragraphes 4.1 et 4.2 ----	4,5
X	GETZENBERG R H ET AL: "THE TISSUE MATRIX CELL DYNAMICS AND HORMONE ACTION" ENDOCR REV, 1990, XP000989539 page 403, colonne de gauche, dernier alinéa page 404, colonne de gauche, alinéa 2 ----	5
A	----	4
X	VERDIER-PINARD, PASCAL ET AL: "A steroid derivative with paclitaxel-like effects on tubulin polymerization" MOL. PHARMACOL., MARCH 2000, 57, 568-575, XP000989650 (mailing for this issue has been completed on 21-12-1999) le document en entier ----	5 11,12
Y	AEBI S. ET AL: "A phase II/pharmacokinetic trial of high-dose progesterone in combination with paclitaxel" CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY_(CANCER CHEMOTHER. PHARMACOL.), 1999, 44/3 (259-265), XP000989537 Germany le document en entier ----	12
A	----	5,11
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De rde internationale No

PCT/FR 01/00816

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	NISHIO K ET AL: "ENHANCED INTERACTION BETWEEN TUBULIN AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2 VIA INHIBITION OF MAP KINASE AND CDC2 KINASE BY PACLITAXEL" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 63, no. 5, 1995, pages 688-693, XP000909268 ISSN: 0020-7136 abrégé	11
P, X	BAULIEU E E: "'NEW' ACTIVE STEROIDS AND AN UNFORESEEN MECHANISM OF ACTION RESUME - DE NOUVELLES ACTIVITES STEROIDES UN MECANISME D'ACTION INATTENDU" COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA VIE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 323, no. 6, juin 2000 (2000-06), pages 513-518, XP000982545 ISSN: 0764-4469 le document en entier	1-7, 9, 10
P, X	MURAKAMI K ET AL: "PREGNENOLONE BINDS TO MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2 AND STIMULATES MICROTUBULE ASSEMBLY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 97, no. 7, 28 mars 2000 (2000-03-28), pages 3579-3584, XP000982542 ISSN: 0027-8424 le document en entier	2-4
Y		5-8, 11, 12
A	NUNEZ J: "MICROTUBULES AND BRAIN DEVELOPMENT: THE EFFECTS OF THYROID HORMONES" NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 7, no. 6, 1985, pages 959-968, XP000989637 ISSN: 0197-0186 le document en entier	5, 7, 10
P, X	WO 00 26229 A (TEIKOKU HOEMOME MFG CO LTD) 11 mai 2000 (2000-05-11) abrégé & AU 62282 99 A 22 mai 2000 (2000-05-22)	5
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De demande internationale No

PCT/FR 01/00816

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,Y	<p>WO 00 71563 A (UNIVERSITY OF HAWAII) 30 novembre 2000 (2000-11-30) abrégé page 5, ligne 30 - ligne 32 page 6, ligne 1 - ligne 6 page 12 -page 14 page 17 page 26; exemple 15 revendications 15-20 -----</p>	<p>5-8,11, 12</p>

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les revendications 1-5,12 présentes ont trait à une très grande variété de composés (revendications 2-5 et 12) et/ou à des composés définis en faisant référence à une/des caractéristiques ou propriété(s) souhaitable(s) (revendication 1). Les termes "protéines constitutantes ou associées aux éléments du cytosquelette", "composés non toxiques" ou "stéroïdes" (revendications 2-5,12) contiennent tant d'options, de variables, de permutations possibles et la revendication 1 couvre tant de produits que le manque de clarté (et/ou de concision) au sens de l'Article 6 PCT qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible.

Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires (et/ou concises), fondées et suffisamment exposées, c'est à dire sur les composés mentionnés en page 13 lignes 7-12 et la pregnenolone (exemplifiée).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De demande internationale No

PCI/FR 01/00816

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9911814	A	11-03-1999	AU	9301898 A	22-03-1999
			EP	1009853 A1	21-06-2000
			WO	9911814 A1	11-03-1999
WO 9964013	A	16-12-1999	AU	4280799 A	30-12-1999
			EP	1085876 A1	28-03-2001
			WO	9964013 A1	16-12-1999
WO 0026229	A	11-05-2000	AU	6228299 A	22-05-2000
			WO	0026229 A1	11-05-2000
WO 0071563	A	30-11-2000	AU	5276300 A	12-12-2000
			WO	0071563 A2	30-11-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)